原 著

ヒト歯槽骨骨膜由来細胞凝集塊（スフェロイド）の微細構造学的形態の 経時的变化

田 胡 和 浩^{*1} 光家由紀子^{*1} 東 一 善^{*2}
 宗 正 憲 和^{*1} 根 本 賢 治^{*1} 辻 上 弘^{*1}
 菅 谷 彰^{*1} 高 橋 理^{*2} 出 口 眞 二^{*1}

^{*1}神奈川県立歯科大学口腔治療学講座歯周病学分野,

^{*2}神奈川県立歯科大学人体構造学講座組織学分野

(受付日: 2011 年 8 月 11 日 受理日: 2012 年 3 月 16 日)

Ultrastructural changes of cell spheroids of human alveolar bone periosteal cells during cell culture

Kazuhiro Tago^{*1}, Yukiko Koke^{*1}, Kazuyoshi Higashi^{*2},
 Norikazu Munemasa^{*1}, Kenji Nemoto^{*1}, Hiroshi Tsujigami^{*1},
 Akira Sugaya^{*1}, Osamu Takahashi^{*2} and Shinji Deguchi^{*1}

^{*1}Department of Oral Medicine, Division of Periodontology, Kanagawa Dental College

^{*2}Department of Anatomy, Division of Histology, Kanagawa Dental College

(Received : August 11, 2011 Accept : March 16, 2012)

Abstract : We previously reported that spheroids containing three-dimensional proliferative cells may be useful for periodontal tissue regeneration. The aim of this study was to observe the changes of human alveolar bone periosteal cells (HABPCs) in spheroids using ultrastructural and immunohistochemical techniques. HABPCs were suspended at a cell density of 1.8×10^4 cells/cm² in a 100-mm culture dish. After 10 days' culture, the cells formed spheroids, which were digested by 0.25% trypsin, and centrifuged at 300 g for 3 min. Furthermore, the spheroids were matured for 1, 3, 7 and 14 days by immersion in a 24-well culture dish. The spheroids were examined at 1 day after formation by transmission electron microscopy, which revealed that the HABPCs were scattered in the whole spheroid. Specimens of spheroids were divided into three zones by the cell localization, namely, surface, middle and central zones, at 3 days. The number of cells in the central zone was decreased on day

連絡先: 田胡和浩

〒 238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町 82 番地

神奈川県立歯科大学口腔治療学講座歯周病学分野

Kazuhiro Tago

Department of Oral Medicine, Division of Periodontology, Kanagawa Dental College

82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan

E-mail : tagokazu@kdcnet.ac.jp

7. In the middle zone on day 14 cells were found at a low density, with numerous collagen fibers observed in the wide intercellular spaces. When the spheroids were cultured for a prolonged period, the collagen synthesis started in the central zone of the spheroids, and gradually moved to the surface zone of the spheroids. An increase in the number of dense granules in the cells was observed. Furthermore, a similar degree of increase of both Osteopontin (OP) - and Osteocalcin (OC) - immunoreactive cells was noted. The results suggested that the cells in the spheroids had the potential for differentiation direction in the spheroids from central to surface zone. And the possibility of bone regeneration following transplantation of HABPC spheroids based on their ability to express OP and OC in alveolar bone.

Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 54(2):155-166, 2012.

Key words: human alveolar bone periosteal cells (HABPCs), spheroid, ultrastructure

要旨: 現在、歯周疾患により喪失した歯周組織を再生のために種々の研究が行われている。我々は、細胞・足場・成長因子を兼ね備えた細胞凝集塊（スフェロイド）をヒト歯槽骨骨膜由来細胞(HABPCs)を用いて作製し、歯周組織再生の臨床応用への可能性を検討した。下顎の歯周外科処置時に骨膜片から採取した細胞をヒト歯槽骨骨膜由来細胞とし、10日間平面培養後、細胞をシート状のまま剥離し遠心沈殿させスフェロイドとした。スフェロイドは、1, 3, 7, 14日間培養後、微細構造学的、免疫組織化学的検索を行った。スフェロイド中の細胞の分布は、形成1日目では、ほぼ均一であったが、経時的に、細胞の形状や配列の差異で、表層、中層、深層の3層に区別できた。また、7日目以降、深層部の細胞数は減少し、14日目では、中層を構成する細胞数も減少した。細胞数が減少した部位では、広い細胞間隙が観察された。コラーゲン線維は、細胞間隙を埋めるように深層部より増加し、順次、中層部、表層部と拡大していった。細胞質中の高電子密度の顆粒やオステオポンチン(OP)、オステオカルシン(OC)陽性反応も同様の傾向を示した。これらのことから、スフェロイド内の細胞が経時的に深層から表層にかけて分化していく可能性が示唆された。ヒト歯槽骨骨膜由来細胞スフェロイドは、歯槽骨内への移植により骨再生が起こる可能性が示唆された。

日本歯周病学会会誌（日歯病誌）54(2):155-166, 2012

キーワード: ヒト歯槽骨骨膜由来細胞, 細胞凝集塊, 微細構造

緒 言

歯周疾患は、歯肉、セメント質、歯根膜および歯槽骨におよぶ炎症性疾患であり、その治療は歯科領域において重要な課題の一つとなっている。その治療法は、種々あるが、失われた歯周組織を回復させる再生療法は最も注目されている方法であり、一般に Guided Tissue Regeneration (GTR 法)¹⁾とエナメルマトリックスポロテイン (EMD)²⁾を応用した方法が用いられている。しかし GTR 法は、その治療形態が健康な歯周組織とは異なっているとの報告もある^{3,4)}。また操作が煩雑であるため、高度な技術を必要とする上、治療に適応とされる骨欠損も限られている。EMD においては、良好な治療成績を収めている一方で、他家由来であるため感染の危険性も否定できない。

歯周組織の再生の初期段階では、骨再生が目標とされる。その骨再生には、骨芽細胞が大きく関与する。この骨芽細胞が骨形成を開始する過程の研究は、種々の報告がある。骨の形成過程においては、骨芽細胞の

活性化により、コラーゲン線維の合成、分泌、非コラーゲン性タンパク質である OP、OC の合成が認められる。OP は骨のリモデリングやメカニカルストレスの調整に関わる骨基質タンパクとして骨組織に豊富に含まれている⁵⁻⁷⁾。また、OC は Runt-related transcription factor 2 及び Activating transcription factor-4 により調整され発現し、成熟した骨芽細胞に特異的に認められる骨基質中に最も豊富に存在する非コラーゲン性タンパク質である^{8,9)}。このことより OP、OC 共に成熟した骨芽細胞のマーカーとして広く用いられている。そして、これらの細胞間基質にハイドロキシアパタイト結晶の沈着が生じて骨が形成される。

骨膜は、線維層と疎性結合組織層の2層で構成される。線維層は厚く緻密な網工をなす膠原線維を主体とし、疎性結合組織層は、骨原性細胞を含み血管に富んでいる。骨原性細胞は、骨芽細胞に分化し、骨組織を形成するため、骨膜は骨形成層とも呼ばれている¹⁰⁾。骨膜は骨芽細胞の供給源として自家骨採取より骨への外科的侵襲が少なく、採取も容易で、患者の負担も軽微であり、再生治療への応用において非常に有効な組

組織であると考えられる。

再生工学によって組織を再生させるためには、環境にあった細胞、その細胞が三次元的に遊走、定着、分化するための足場、そして細胞の増殖、分化を調節するための増殖因子の三要素が必要である¹¹⁾。足場については、近年、ナノテクノロジーを用いた研究、コラーゲン、 β -Tricalcium Phosphate を用いた研究がなされている。細胞増殖因子については、Bone morphogenetic protein-2^{12,13)}、Fibroblast growth factor-2^{14,15)}、Transforming growth factor- β 1¹⁶⁾ などを用いた研究が行なわれている。また、1998年に、Marx らが自己血由来の多血小板血漿の骨移植術への応用について報告している¹⁷⁾。これらの研究は、研究レベルでは成果があるものの、臨床においてはまだ確立されていないものが多い。

医療領域では、この3つの要素を全て合わせ持つスフェロイドの研究が進められている。スフェロイドとは、細胞が多数集合し形成された細胞凝集体のことである¹⁸⁾。平面で培養した細胞と比較し、スフェロイド中の細胞は立体的に培養されることにより細胞内分子群が秩序的に配置され極性を有し、細胞間接着構造を形成するようになると報告されている。そのため、生体組織に近い環境にあり、生体組織に近い機能を持つといわれている^{19,20)}。

再生医療の分野では、肝臓の再生における肝スフェロイド^{21,22)}、関節軟骨再生の為に軟骨細胞と滑膜由来細胞の両者を含有する細胞スフェロイド²³⁾や、三次元培養皮膚の為に真皮線維芽細胞スフェロイド²⁴⁾が作製され、機能が評価されている。細胞の機能解析では、スフェロイドが生体に近い代謝や物質の合成および輸送を行うことから、肝臓、心筋、神経、子宮内膜等の細胞の生理機能解析に用いられている²⁵⁾。薬剤の効果判定では、スフェロイド培養により細胞を生体内の状態に近似させることにより創薬のハイスループットスクリーニングが可能となっている²⁶⁾。

また、癌悪性形質の解析では、癌細胞スフェロイドは、癌組織に類似しているため癌細胞の浸潤や転移等の動態解析に活用されている²⁷⁻³⁰⁾。

スフェロイドの形成方法^{31,32)}には、回旋培養法、磁気を利用する方法³³⁾、非付着性培養皿に細胞懸濁液を播種する方法³⁴⁾、温度感受性培養皿を用いて平面単層培養した細胞シートを積層化させる方法^{35,36)}などがある。細胞シートにおいては、角膜³⁷⁾、食道³⁸⁾、心臓³⁹⁾への移植が行われている。歯科領域では、骨膜シート^{40,41)}、歯根膜シート⁴²⁾を用いた歯周組織再生治療の研究も行われている。我々は、スフェロイド作製方法として遠心沈殿させる手法⁴³⁾を応用し、歯周組

織由来細胞でスフェロイドを作製し、歯周組織再生への応用を試みた。辻上らはヒト歯周組織由来細胞において、スフェロイドの形成を行い、その長期培養での細胞増殖やコラーゲンの発現を確認している^{44,45)}。また、吉川らはヒト歯槽骨由来細胞における、I型コラーゲン、OP、OCの発現を報告している⁴⁶⁾。スフェロイドの特徴として、細胞を球状化し、立体的構造をすることにより細胞間基質の増加、I、III型コラーゲンの増加が観察されている。しかし、その形態学的検索は、光学顕微鏡の検索のみであり、細胞小器官等の検索は行われていない。電子顕微鏡観察では、光学顕微鏡観察では確認が難しい細胞小器官の状態による細胞活性の分化程度、細胞膜破損による細胞の生死判定などを確認することが可能である。この点を考慮して、本研究では電子顕微鏡を用いてスフェロイド形成における経時的な細胞小器官の変化と、OP、OCの免疫染色を通じてスフェロイドにおける骨再生過程を検索することを目的としている。本研究では、患者に負担の少ない歯槽骨骨膜由来細胞のスフェロイドを作製し、その形成期間を変えてスフェロイド中の細胞の形態学的変化を微細構造学的、免疫組織学的に検索した。

材料および方法

1. 細胞培養

HABPCsは、神奈川歯科大学倫理委員会の承諾のもと、神奈川歯科大学付属病院に来院したインフォームドコンセントの得られた患者で、歯周外科処置時に部分層弁にて剥離した歯槽骨上の組織を採取した。この組織を歯槽骨骨膜片とし10% Fetal Calf Serum (FCS: Whittaker Bioproducts, USA) 0.25 mM L-ascorbic acid · 2-phosphate (WAKO, 大阪), 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin (GIBCO, USA), 3.5 mg/ml D-gulose (WAKO, 大阪)を添加した α -MEM (Minimum Essential medium: 日水製薬, 東京)にて十分洗浄後、24 multi well plate (Becton, Dickinson and Company, USA)上に播種し、15 mm round thermax coverslip (Nalge Nunc International, USA)にて圧迫固定し、37°C、5% CO₂の湿潤気相下にて培養を行った。組織片より分離した細胞を0.25% Trypsin (Difco, USA)を含むPBS (-) (Ca²⁺ and Mg²⁺ free phosphate buffered saline: 日水製薬, 東京)にて剥離し、継代培養した。その後、2日毎に培地交換しながら継代培養を繰り返した。本研究では、第5代目の培養細胞を使用した。なお、本研究は、ヘルシンキ宣言を遵守し行った。

2. スフェロイド形成

スフェロイドの作製方法は、吉川らの方法に従った⁴⁶⁾。すなわち、HABPCsを 1.8×10^4 cell/cm²の細胞密度で100 mm culture dish (Becton, Dickinson and Company, USA)に播種し、2日毎に10% FCS含有 α -MEMで培地交換し、培養を行った。培養10日後、コンフルエントに達した平面培養細胞を0.25% Trypsinで100 mm culture dishから細胞シートのまま剥離し、300 G、3分間遠心沈殿して、直径約3 mm 球状細胞塊を形成しスフェロイドとした。スフェロイド形成後、24 multi well plateにて、2日ごとに10% FCS含有 α -MEMで培地交換し、1, 3, 7, 14日間培養したものを観察に使用した。

3. 微細構造

採取した骨膜は、生理食塩水にて3回洗浄し、0.1 M PBS(pH 7.3)にて希釈した冷2.5 %グルタルアルデヒド液(WAKO, 大阪)で40分間、前固定し、さらに1%オスミウム酸液(WAKO, 大阪)で40分間、後固定を行った。その後、漸次エタノール系列で脱水し、酸化プロピレン(WAKO, 大阪)を介してspurr樹脂(TAAB, UK)に包埋した。また、形成したスフェロイドも同様に処理した。包埋した試料は、ガラスナイフを用いたMT-1型ウルトラミクロトームにて約1 μ mの厚切り切片を作製し、トリイジンブルー染色を施した。光学顕微鏡下で試料の部位を確認した後、ダイヤモンドナイフを用いた同型ミクロトームにて薄切した。薄切切片は酢酸ウラニル(日新EM, 東京)とクエン酸鉛(日新EM, 東京)による二重染色を施し、透過型電子顕微鏡(JEM1220, 日本電子)にて観察した。

4. 免疫組織化学的検索

スフェロイド中のOPおよびOCの発現は、免疫組織化学的手法を用いて検索した。まず、形成したスフェロイドを、PBS(-)にて3回洗浄、4%パラホルムアルデヒド(WAKO, 大阪)で48時間固定を行った。固定後、漸次エタノール系列で脱水、水溶性樹脂(LR-White 日新EM, 東京)に包埋した。

約0.5 μ mに薄切した切片をスライドガラスに貼り付け、PBS(-)にて洗浄後、10% Normal Goat Serum (NGS)で30分間Blockingした。10% NGSにて抗OP抗体(1500倍希釈, Millipore, USA), 抗OC抗体(25倍希釈, AbD Serotec, UK)を希釈し、4℃にて一晩作用させた。PBS(-)にて3回洗浄後、OPには、二次抗体として抗ウサギIgG Alexa Fluor 488(WAKO, 大阪)を標識物質として用いた。OCには、二次抗体とし

図1 スフェロイドの作製方法

- a: HABPCs 平面培養10日目のコンフルエントに達した位相差顕微鏡像
b: 0.25 % Trypsinで100 mm culture dishから細胞シートのまま剥離し、300 G、3分間遠心沈殿したもの
c: スフェロイド形成3日後
d: スフェロイドの肉眼所見。直径約3 mm。

て抗ウサギIgG ビオチン標識(DAKO, Denmark)を1時間作用させ、PBS(-)にて3回洗浄後、Cy-3 (SIGMA, USA)を標識物質として用いた。各々PBS(-)にて3回洗浄後、グリセリンにて封入した。その後、共焦点レーザー顕微鏡(Nikon E800)にて観察した。

結 果

1. スフェロイドの肉眼的所見

平面培養細胞を、遠心沈殿したものは不定形であったが、1日経過後には球状となった。スフェロイドの大きさは、約3 mmであった(図1a~d, 図2)。

2. 正常ヒト歯槽骨由来骨膜の微細構造

骨膜細胞の形状は、紡錘形を呈していた。細胞の周囲には、多くのコラーゲン線維が存在しており、そのコラーゲン線維の横断像や縦断像が認められた。また、一部のコラーゲン線維は、細胞膜に直角に接している像が認められた(図3a)。骨膜細胞の横断像では細胞中央部には、比較的明るい円形の核が認められ、細胞質中には、ミトコンドリアや内腔がやや拡張した

図2 スフェロイドのイメージ像
中心部より表面に向かって深層(D)、中層(M)、表層(S)の3層に区別できた。

図3 正常ヒト歯槽骨由来骨膜の微細構造

- a: 骨膜細胞の縦断像を示す。紡錘形を呈している細胞の周囲には、多くのコラーゲン線維が存在しており、そのコラーゲン線維の横断像や縦断像が認められた。また、一部のコラーゲン線維は、細胞膜に直角に接している像が認められた(矢印)。
- b: 骨膜細胞の横断像を示す。骨膜細胞には、ミトコンドリアや内腔が拡張した粗面小胞体等の細胞小器官が観察された。

粗面小胞体等の細胞小器官が観察された(図3b)。

3. スフェロイド形成1日目の組織像および微細構造

スフェロイド形成1日目の組織にトルイジンブルー染色を施して光学顕微鏡で観察すると、その細胞の形状と分布密度から表面から表層(S)、中層(M)、深層(D)に区別された。表層細胞は扁平形を呈していたが、他の部位では、細胞はやや密集しており、深層では細胞間隙も認められた(図4a)。

スフェロイド形成1日目の組織を電子顕微鏡で観察すると、最表層の細胞は、その形状が紡錘形を呈して認められた。また、それらの細胞の細胞小器官の発達は認められず、わずかにミトコンドリアや粗面小胞体が散在していた(図4b)。中層の細胞の形状は、紡錘

図4 スフェロイド形成1日目の組織像および微細構造

- a: スフェロイド形成1日目の試料にトルイジンブルー染色を施して光学顕微鏡で観察したもの。表層細胞は、扁平形を呈していた。他の部位では、細胞はやや密集しており、深層では細胞間隙も認められた。
- b-d: スフェロイド形成1日目の試料を電子顕微鏡で観察したもので、それぞれbは最表層を、cは中層、dは深層の細胞を示す。
- b: 最表層の細胞は、その形状が紡錘形を呈して認められた。
- c: 中層の細胞の形状は、紡錘形を呈して認められ、細胞質中には微細な高電子密度を有する小顆粒が散在(矢印)、あるいは集合(矢頭)して認められた。
- d: 深層の細胞を示す。中程度の電子密度を有する細胞と明調で低電子密度を示す細胞の両者が認められた。しばしば、中程度の電子密度を示す細胞が低電子密度を示す細胞を取り囲んでいるような像が認められた。

形を呈して認められ、細胞質中には微細な高電子密度を有する小顆粒が散在、あるいは集合して認められた(図4c)。深層の細胞の形状は、卵円形から円柱形を呈していた。それらの細胞では、中程度の電子密度を有する細胞と明調で低電子密度を示す細胞の両者が認められた。しばしば、中程度の電子密度を示す細胞が低電子密度を示す細胞を取り囲んでいるような像が認められた。中程度の電子密度を有する細胞には、細胞小器官が豊富に認められた(図4d)。

4. スフェロイド形成3日目の組織像および微細構造

スフェロイド形成3日目の組織像では、スフェロイドは、3層に区別できた。表層の細胞の形状は、扁平形として認められた。中層付近の細胞は、やや密集化

図5 スフェロイド形成3日目の組織像および微細構造

- a: スフェロイド形成3日目の組織像を示す。スフェロイドは、表層(S)、中層(M)、深層(D)の3層に分かれていた。表層の細胞の形状は、扁平形として認められた。中層付近の細胞は、やや密集化して認められ、深層では、それらの細胞の間に細胞間隙が明瞭に認められた。
- b: 表層の細胞の電子顕微鏡像を示している。表層の細胞は、扁平な形状を呈しており、細胞小器官の発達はあまり認められない。
- c: 中層の細胞を示す。細胞の形状は、やや紡錘形から卵円形を呈しており、細胞質中には細胞膜に接していくつかの取り込み小胞が認められた(矢印)。また、細胞質中には、中程度の電子密度を有する円形の構造物や高電子密度のライソゾームが散在していた。また、この他に孤立線毛が認められた(矢頭)。さらに高電子密度を有する小顆粒の集合体が認められた。
- d: 深層の細胞の形状は、立方～卵円形を呈す中程度～低電子密度の細胞が散在していた。低電子密度の細胞を中程度の電子密度を示す細胞が取り囲んでいる像がしばしば認められた。中程度の電子密度を示す細胞には中程度の顆粒や、細胞膜に接して多くの低電子密度の顆粒様構造物が認められた。さらに、細胞質中には、不規則な小型の高電子密度を有する構造物が散在していた。また、低電子密度の細胞質中には高電子密度の芯を有する小型の顆粒を含有していた(矢印)。

して認められ、深層では、それらの細胞の間に細胞間隙が明瞭に認められた(図5a)。

表層の細胞を電子顕微鏡で観察すると、表層の細胞は、扁平な形状を呈しており、細胞小器官の発達はあまり認められなかった(図5b)。中層の細胞では、細胞の形状は、やや紡錘形から卵円形を呈していた。これらの細胞の細胞質中に細胞膜に接するようにいくつ

かの明らかに取り込み小胞と考えられる構造物が認められた。また、細胞質中には、中程度の電子密度を有する円形の構造物や高電子密度のライソゾームが散在していた。また、この他に孤立線毛が認められたほか、高電子密度を有する小顆粒の集合体が認められた(図5c)。深層の細胞の形状は、立方から卵円形を呈して、中程度から低電子密度を有する細胞が散在していたが、低電子密度の細胞を中程度の電子密度を示す細胞が取り囲んでいる像がしばしば認められた。中程度の電子密度を示す細胞中に不規則な核が認められ、細胞質中には中程度の電子密度の顆粒や、細胞膜に接して多くの低電子密度の顆粒様構造物が認められた。さらに、細胞質中には、不規則な小型の高電子密度を有する構造物が散在していた。また、低電子密度の細胞質中には高電子密度の芯を有する小型の顆粒を含有していた(図5d)。

5. スフェロイド形成7日目の組織像および微細構造

スフェロイド形成7日目の組織像では、その細胞の形状によって、明確に3層に区別出来るようになった。表層の細胞は、扁平形を呈していた。また、中層では、細胞密度が高くなり、深層では、多くの細胞間隙が認められた(図6a)。

電子顕微鏡で観察すると、表層の細胞の形状は、扁平形を呈しており、いくつかの中程度の電子密度の顆粒が認められた。細胞間隙には、コラーゲン線維が認められた(図6b)。中層の細胞では、細胞の形状は星形を呈し、多くの突起を細胞間隙に伸ばしている細胞も認められた。また細胞質中には小型の顆粒様構造物が散在していたほか、多くの取り込み小胞が認められた(図6c)。深層の細胞では、大部分の細胞は低電子密度を示し、細胞小器官が破損し、細胞質中に多くの空胞様構造物が認められた。さらに、広い細胞間隙には、コラーゲン線維が認められるほか明らかに細胞が破損したあとに認められる細胞小器官が散在していた(図6d)。

6. スフェロイド形成14日目の組織像および微細構造

スフェロイド形成14日目の組織像では、表層には扁平な細胞が認められた。中層では、細胞が濃染し、中層の占める割合が著しく減少し、かつ中層を構成する細胞数にも減少が認められた。深層では、広い細胞間隙の間に少数の細胞が散在していた(図7a)。

電子顕微鏡で観察すると、表層の細胞は、7日目と比較し、細胞の形状は、さらに扁平化して認められた。高電子密度の小顆粒様構造物が細胞質中に散在していた

図6 スフェロイド形成7日目の組織像および微細構造

- a: スフェロイド形成7日目の組織像を示す。明確に3層 (S, M, D) に区別出来た。表層の細胞は、扁平形を呈していた。また、中層では、細胞の分布密度が増加しており、深層では、多くの細胞間隙が認められた。
- b: 表層の細胞を示す。細胞形態は、扁平形を呈しており、いくつかの中程度の電子密度の顆粒を含有していた。細胞間隙には、コラーゲン線維が認められた。
- c: 中層の細胞を示す。その細胞の形状は星形を呈し、多くの突起を細胞間隙に伸ばしている細胞も認められた。また細胞質中には小型の顆粒様構造物が散在していたほか、多くの取り込み小胞(矢印)が認められた。
- d: 深層の細胞を示す。深層の大部分の細胞は、細胞小器官が破損し、細胞質中に多くの空胞様構造物が認められた。さらに、広い細胞間隙には、コラーゲン線維が認められるほか明らかに細胞が破損したものと考えられる像が多数観察された。

(図7b)。

中層の細胞の形状は、卵円形を呈していた。その細胞の核の形状は、不規則で起伏に富み、細胞質に占める割合は多かった。細胞質中にいくつかの高電子密度の顆粒と多くの取り込み小胞が認められ、その付近には、ゴルジ装置も観察された。細胞は、互いに隣接しているが、その間隙にはコラーゲン線維も認められた(図7c)。深層の細胞では、星状から卵円形を呈する細胞の核は、不規則で、細胞質中には多くの高電子密度の顆粒が認められた。さらに、低電子密度の顆粒の辺縁部に高電子密度の構造物が存在しているほか、低電子密度を示す部分には、点状から網状の中程度の電子密度を有する構造物も観察された。さらに、細胞膜に面して多くの取り込み小胞が散在していた。広い細胞間隙には、コラーゲン線維や破損した細胞の一部と考

図7 スフェロイド形成14日目の組織像および微細構造

- a: スフェロイド形成14日目の組織像を示す。表層には、扁平な細胞が認められた。
- 中層では、細胞が濃染し、中層の占める割合が著しく減少し、かつ中層を構成する細胞数にも減少が認められた。深層では、広い細胞間隙の間に少数の細胞が散在していた。
- b: 表層の細胞を示す。7日目と比較し細胞の形状は、扁平化して認められた。高電子密度の小顆粒様構造が細胞質中に散在していた。
- c: 中層の細胞を示す。立方～卵円形を呈する細胞の核の形状は、不規則で細胞質に占める割合は多かった。細胞質中に若干の高電子密度の顆粒と多くの取り込み小胞(矢印)が認められ、その付近には、ゴルジ装置(矢頭)も観察された。細胞は、互いに隣接しているが、その間隙にはコラーゲン線維も認められた。
- d: 深層の細胞を示す。星状～卵円形を呈する細胞の核は、不規則で、細胞質中には多くの高電子密度の顆粒が認められた。さらに、低電子密度の顆粒の辺縁部に高電子密度の構造物が存在しているほか、低電子密度を示す部分には、点状～網状の中程度の電子密度を有する構造物も観察された(矢印)。さらに、細胞膜に面して多くの取り込み小胞が散在していた。広い細胞間隙には、コラーゲン線維や破損した細胞の一部と考慮される構造および細胞に含有されているものと同様な高電子密度の顆粒も認められた。

えられる構造および細胞に含有されているものと同様な高電子密度の顆粒も認められた(図7d)。

7. スフェロイド形成1日目の免疫組織像

球状にして、培養1日目のスフェロイドに OP およ

図8 スフェロイドの免疫組織化学染色像

びOCの免疫染色を施して共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、OP、OCともに免疫反応は全層にわたって陰性を示した(図8 a, b)。

8. スフェロイド形成3日目の免疫組織像

3日目では、OP、OC免疫反応は、深層部の細胞で陽性を示した。OP、OCともに核の免疫反応は陰性を示した。OC免疫反応はOP免疫反応の結果に比較して弱い反応を示した(図8c, d)。OP、OCともに中層、表層では、免疫反応は陰性を示した。

9. スフェロイド形成7日目の免疫組織像

7日目のOPの免疫染色では、深層から中層までの細胞に陽性反応が認められた。しかし、表層では、免疫反応は陰性を示した。OC免疫反応は、深層のみの細胞に陽性反応が認められた(図8e, f)。深層でのOC免疫反応は、3日目のものと比較するとより強い陽性反応を示した。

- a: スフェロイド形成1日目の深層(D)のオステオポンチン免疫染色像を示す。全層にわたって免疫反応は陰性を示した。
- b: スフェロイド形成1日目の深層(D)のオステオカルシン免疫染色像を示す。全層にわたって免疫反応は陰性を示した。
- c: スフェロイド形成3日目の深層(D)のオステオポンチン免疫染色像を示す。細胞質に免疫反応は陽性を認めたが、核は陰性を示した(矢印)。中層、表層では、免疫反応は陰性を示した。
- d: スフェロイド形成3日目の深層(D)のオステオカルシン免疫染色像を示す。細胞質に免疫反応は陽性を認めたが、核は陰性を示した(矢印)。中層、表層では、免疫反応は陰性を示した。
- e: スフェロイド形成7日目の深層(D)から中層(M)のオステオポンチン免疫染色像を示す。表層では、免疫反応は陰性を示した。
- f: スフェロイド形成7日目の深層(D)のオステオカルシン免疫染色像を示す。3日目と比較して陽性反応は強かった。中層、表層では、免疫反応は陰性を示した。
- g: スフェロイド形成14日目の全層(D, M, S)のオステオポンチン免疫染色像を示す。全層の細胞の細胞質だけでなく、細胞間隙にも免疫陽性反応が認められた。
- h: スフェロイド形成14日目の全層(D, M, S)のオステオカルシン免疫染色像を示す。全層の細胞に免疫陽性反応が認められた。

10. スフェロイド形成14日目の免疫組織像

14日目では、OP、OC免疫反応は、ともに深層から表層までの細胞に陽性反応が認められた。OPは、細胞だけではなく細胞間隙にも陽性反応が認められ、OCは、細胞にのみ陽性反応が認められた(図8 g, h)。

考 察

歯周組織の再生において、GTR法やEMDを応用した方法が用いられているが、より多くの組織再生を求めるには、単一の方法では難しく、移植との併用がより効果的である。移植には、人工材料が広く用いられてきたが、近年、生体材料を用いた再生治療が研究されている。再生工学によって組織を再生させるためには、細胞、足場、増殖因子の三要素が必要であると考えられている。歯科における再生治療で、その中心になるのは、歯周組織の再生であり、そのうち特に歯槽骨の再生が重要であると考えられている。骨を再生させるためには、立体的な骨再生が生じるスペースの確保が必要である。この歯槽骨再生に培養細胞を用いる場合、主として平面培養を用いた研究が行われてい

るが、骨再生を生じさせるためのスペース確保は難しい。本研究で作製した骨膜由来細胞スフェロイドは、三次元構造を有しているため、骨再生のためのスペース確保は容易である。さらに移植時においても、形態が安定しているため、平面培養細胞と比較すると取り扱いが非常に簡便である。また、三次元構造であることにより、平面培養と比較し、細胞がより生体に近い環境で存在していると考えられる。今回使用した遠心沈殿させて作製するペレット法^{43,46)}は、細胞を均一に高密度に凝集させることができ、かつスフェロイド形成が簡便である。しかし、このような三次元構造を有した細胞凝集塊について、経時的な微細構造学的変化について検索したものは皆無である。

採取したヒト骨膜を電子顕微鏡で観察すると立方形で核の占める割合が大きく細胞質中に多くの自由リボゾームを有している細胞等が認められた。自由リボゾームが豊富である細胞には、細胞小器官の発達が認められないことから、これら細胞は未分化な細胞であると考えられた。さらに、コラーゲン線維の横断像や縦断像が混在して認められることから、コラーゲン線維の網目構造が立体的であるものと考えられた。また、細胞膜に対して直角に接しているコラーゲン線維が多数認められ、また、それらの細胞中には内腔の拡張した粗面小胞体が認められることから、骨膜細胞によりコラーゲン線維が産生されている像であると考えられた。

スフェロイド形成後1日目の細胞の形状は様々であり、かつスフェロイド全域にほぼ均一に分布していた。また、その細胞形状は、平面培養時の形状と差異は認められなかった。またスフェロイドを形成する細胞の細胞間隙には多くのコラーゲン線維が認められたが、それらの間に存在する細胞中の細胞小器官の発達が認められないことから、このコラーゲン線維は、スフェロイド形成以前の平面培養時に形成されたものと考えられる。さらに、スフェロイドの深層、すなわち中心部付近の細胞では豊富な細胞小器官が認められたことや、電子密度の異なった細胞が混在しており、培養以前の骨膜細胞とは形態的差異が認められた。このことは、スフェロイド形成1日目の深層の細胞では、細胞分化が生じている可能性がある。しかし、OP、OC陽性反応が認められないことから、分化していてもごく初期であると考えられた。表層から中層の細胞の形状は、骨膜細胞と差異は認められなかった。

スフェロイド形成後3日目では表層の細胞の形状は、扁平形として認められたが、細胞小器官の発達はあまり認められなかった。中層の細胞の細胞質中には中程度の電子密度を有する円形の構造物やライソゾームが

散在していた。また、中層の細胞には、孤立線毛を持つ細胞が認められた。孤立線毛の存在は、種々の器官、組織で報告されている⁴⁷⁻⁵¹⁾。また、孤立線毛の機能についても種々の説があるが、細胞分裂の抑制との関連を示唆する報告もある^{52,53)}。このことから、中層では、増殖に関与していない細胞が存在する可能性がある。深層の細胞の形状は、立方から卵円形を呈し、細胞が密集している部位も観察されたが、1日目の深層と比較し、やや広い細胞間隙が見られる部位が認められた。細胞が密集している部位では、低電子密度の細胞を中程度の電子密度の細胞が取り囲んでいた。中程度の電子密度を示す細胞質中には、細胞膜に接して低電子密度の円形の顆粒が多く認められた。また低電子密度の細胞の細胞質中には高電子密度の芯を有する小型の顆粒が認められた。この電子密度を有する顆粒や低電子密度の顆粒が混在し、かつ、その中間にあると考えられる顆粒も存在していたことから、これらの顆粒は全て同じものであり、様々な電子密度の顆粒が存在していることは、顆粒の成熟に関係しているものと考えられた。また、深層においては、OP、OC陽性反応が認められたことから、スフェロイド形成3日目では、深層～中層の細胞において細胞分化が生じている可能性が考えられた。

スフェロイド形成後7日目では、表層の細胞の形状は、扁平形として認められ、細胞間隙は広がっていた。広がった細胞間隙には、多くのコラーゲン線維が認められた。細胞内には、3日目の中層で見られたものと同様の中程度の電子密度の顆粒が確認できた。この顆粒の出現は、中層から徐々に表層へ移行していることが示唆された。中層の細胞の細胞質中には、小型の顆粒様構造物が散在していた。この小型の顆粒様構造物の形状は、グリコーゲン顆粒と形態的差異は認めなかった。このことより、グリコーゲン顆粒の貯蔵が行われていると考えられる。また、多数の取り込み小胞、粗面小胞体、ゴルジ装置が観察された。このことから、コラーゲン合成が深層の細胞から中層の細胞まで拡大したことが考えられた。大部分の深層の細胞は、ミトコンドリアや細胞小器官等の変性像が認められたことから、これらの細胞は死滅していく過程にあるものと考えられた。また、細胞質中に多くの空胞様構造物が認められた。さらに、広い細胞間隙には、コラーゲン線維が認められたほか、細胞の破損像が認められた。スフェロイドは、大きさが増すほど内部での酸素不足と物質交換が不十分となり、内部の細胞が壊死するといわれている。その大きさは、癌細胞では直径500 μ m程度⁵⁴⁾、肝細胞では直径100～150 μ m程度^{55,56)}との報告もある。今回形成したスフェロイドは、直径約

3 mm (3000 μ m)であった。これは、前述の他の細胞のスフェロイドと比較すると6~20倍程度大きい。7日目のスフェロイド中心部での細胞壊死は、スフェロイドの大きさによる栄養不足も可能性として考えられた。これらのことから、7日目のスフェロイド深層では、物質交換不足により細胞が死滅し、細胞間隙の拡張が生じたことが考えられた。さらに、拡張した細胞間隙に、コラーゲン線維が分泌されたと考えられる。また、深層から中層においてOP陽性反応が、深層においてはOC陽性反応が認められたことから、中層から表層の細胞において細胞分化が生じている可能性が考えられた。

スフェロイド形成後14日目では、明瞭に表層、中層、深層の3層に区別されたが、そのうち表層と深層の占める割合が拡大し、中層の占める割合は少なくなった。中層を構成する細胞数は減少したが、その形状は、立方から卵円形を呈しており、その核の形状は、不規則で起伏に富み、細胞質に占める割合は大きかった。細胞質中には、ゴルジ装置などの細胞小器官や多数の取り込み小胞が認められた。さらに、若干の高電子密度の顆粒も認められた。細胞は、互いに隣接しており、細胞間隙にはコラーゲン線維も認められた。このことは、中層では細胞数の減少が生じたが、残った細胞は活性化が高いものと考ええる。深層の細胞の細胞質中には、多くの高電子密度の顆粒と多くの取り込み小胞が存在していた。さらに、低電子密度の顆粒の辺縁部に高電子密度の構造物が存在しているほか、低電子密度を示す部分には、点状から網状の中程度の電子密度を有する構造物も観察された。この様に、種々の形状の顆粒が認められ、他の細胞では高電子密度の顆粒のみ存在していたことは、顆粒の成熟過程を示しているものと考えられる。すなわち、低電子密度の顆粒中に高電子密度の構造物が出現し、やがて高電子密度の顆粒へと変化するものと考ええる。このような現象は、唾液腺の分泌顆粒の成熟過程に類似している⁵⁷⁾。

これらのことから、スフェロイド形成14日目では、全層においては、OP、OC陽性反応が認められたことから、深層では細胞の壊死が、中層から表層の細胞においては、7日目より細胞分化が生じている可能性が考えられた。

スフェロイド形成後、培養期間が長期化すると、コラーゲン線維は最初にスフェロイド深層部より増加し、順次、中層部、表層部と拡大していった。また、細胞質中の高電子密度の顆粒も同様の傾向を示した。またOP、OC陽性反応も同様の傾向を示した。このことから、スフェロイドが経時的に深層から表層にかけて分化していく可能性が示唆された。また、電顕で

観察された顆粒の出現と、免疫染色で観察されたOP、OCとの関連が考えられた。本結果より、スフェロイドの移植により骨再生がおこる可能性が示唆された。しかし、7日目以降のスフェロイド深層部では、栄養不足と考えられる細胞の壊死像が観察されたことより、移植に用いる場合、形成後7日以前のスフェロイドを使用するほうが望ましいと考えられた。

今後、スフェロイドの適切な大きさの検討や、免疫電顕による顆粒と骨形成の関連についてさらに検討する必要がある。

本研究は、平成18年度文部科学省科学研究費若手研究(B)課題番号17791565の補助を受けて行った。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本件研究遂行に対し、ご理解とご指導を戴きました口腔治療学講座歯周病学分野および人体構造学講座組織学分野の諸先生方に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、第96回アメリカ歯周病学会共催日本歯周病学会2010大会(平成22年10月31日~11月2日)において発表した。

文 献

- 1) Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 9 : 290-296, 1982.
- 2) Heiji L : Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol*, 24 : 693-696, 1997.
- 3) Araújo M, Berglundh T, Lindhe J : The periodontal tissues in healed degree III furcation defects. An experimental study dogs. *J Clin Periodontol*, 23 : 532-541, 1996.
- 4) Araújo M, Berglundh T, Lindhe J : On the dynamics of periodontal tissues formation in degree III furcation defects. An experimental study dogs. *J Clin Periodontol*, 24 : 738-746, 1997.
- 5) Yumoto K, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Tsuchiya Y, Kon S, Nifuji A, Ueda T, Denhardt DT, Noda M : Osteopontin deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 : 4556-4561, 2002.
- 6) Ishijima M, Rittling SR, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M : Enhancement of osteoclastic bone resorption and

- suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin. *J Exp Med*, 193 : 399-404, 2001.
- 7) Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M : Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 : 8156-8160, 1999.
- 8) Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G : *Osf2/Cbfa1* : a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89 : 747-754, 1997.
- 9) Xiao G, Jiang D, Ge C, Zhao Z, Lai Y, Boules H, Phimpilalai M, Yang X, Karsenty G, Franceschi RT : Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and *Runx2/Cbfa1* stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *J Biol Chem*, 280 : 30689-30696, 2005.
- 10) 藤田尚男, 藤田恒夫 : 標準組織学 総論, 第4版, 医学書院, 東京, 2002, 198.
- 11) Langer R, Vacanti JP : *Tissue Engineering*. Science, 260 : 920-926, 1993.
- 12) Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjö UM : Periodontal repair in dogs : recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol*, 66 : 131-138, 1995.
- 13) Kinoshita A, Oda S, Takahashi K, Yokota S, Ishikawa I : Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol*, 68 : 103-109, 1997.
- 14) Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama Y, Tamura M, Ogata E, Matsumoto T : Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology*, 135 : 774-781, 1994.
- 15) Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, Terashima A, Asano T, Okada H : Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res*, 34 : 425-430, 1999.
- 16) 中瀬尚長, 岩崎幹季, 中原治彦, 木村友厚, 高岡邦夫, 小野啓郎 : 骨膜細胞に対する TGF- β 1 および BMP-2 の作用. *骨折*, 16, 9-13, 1994.
- 17) Marx ER, Garg AK. Dental and craniofacial applications of platelet-rich plasma. *Chicago : Quintessence Pub.* : 3-49, 2005.
- 18) 吉里勝利 : 特集によせて, 特集創傷治癒の細胞生物学. *細胞* 22(5) : 162, 1990.
- 19) Otsuka H ; Hirano A ; Nagasaki Y ; Okano T ; Horiike Y ; Kataoka K : Two-dimensional multiray formation of hepatocyte spheroids on a micro-fabricated PEG-brush surface. *Chembiochem*, 5: 850-5, 2004.
- 20) Satomi T ; Nagasaki Y ; Kobayashi H ; Tateishi T ; Kataoka K ; Otsuka H : Physicochemical characterization of densely packed poly (ethylene glycol) layer for minimizing nonspecific protein adsorption. *J Nanosci Nanotechnol*, 7 : 2394-9, 2007.
- 21) Koide K, Sakaguchi K, Koide Y, Asano K, Kawaguchi M, Matsushima H, Takenami T, Mori M and Tsuji T : Formation of multicellular spheroid composed of adult rat hepatocyte in dish with positively charged surfaces and under other non adherents. *Exp. Cell Res*, 186 : 227-235, 1990.
- 22) Tong JZ, Bernard O and Alverez F : Longterm culture of rat liver cell spheroids in hormonally define media. *Exp. Cell Res*, 189 : 87-92, 1990.
- 23) 李 禎翼, 佐藤正人, 三谷玄弥, 持田譲治 : 関節軟骨修復・再生を目指した軟骨滑膜混合細胞体の開発. *東日本整形災害外科学会雑誌*, 22 : 207-213, 2010.
- 24) 依田理美, 里見智美, 上野耕治, 大塚英典 : 三次元培養皮膚の創製を目指した真皮線維芽細胞スフェロイドの作製と機能評価. *FRAGRANCE JOURNAL*, 36 : 65-69, 2008.
- 25) Lin RZ, Chang HY : Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research.3 : 1172-1184, 2008.
- 26) Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W : Multicellular tumor spheroids : an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol*, 148 : 3-15, 2010.
- 27) 佐々木武仁 : 培養固形腫瘍モデル (スフェロイド) の腫瘍生物学的研究における利用. *放射線生物研究*, 19 : 195-208, 1984.
- 28) 佐々木武仁, 増山祥二 : 多細胞球状体 (スフェロイド) における固形腫瘍の放射線感受性の比較. *組織培養研究*, 4(2) : 12-16, 1985.
- 29) Friedl P, Gilmour D : Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 : 445-457, 2009.
- 30) Sugino T, Kusakabe T, Hoshi N, Yamaguchi T, Kawaguchi T, Goodison S, Sekimata M, Homma Y, Suzuki T : An invasion-independent pathway of blood-borne metastasis : a new murine mammary tumor model. *Am J Pathol*, 160 : 1973-1980, 2002.
- 31) Okubo H, Matsushita M, Kamachi H, Kawai T, Nishikawa K, Fujimoto T, Todo S : Maintenance of morphology and function of mixed liver cell spheroids under collagen gel environment. *J artificial organs*, 4 : 331-335, 2001.
- 32) Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T, Yokono T, Mochizuki Y : Reconstruction of hepatic organoid by

- rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells, *Hepatology*, 29 : 111-125, 1999.
- 33) Ito A, Takizawa Y, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M, Kobayashi T : Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force : heterotypic layers of cocultured hepatocytes and endothelial cells. *Tissue Eng* 10 : 833-840, 2004.
- 34) Carlson J, Yuhans M : Liquid-overlay culture of cellular spheroid. In : Recent results in cancer research : Spheroids in cancer research. Acker H, Carlson J, Durand R and Sutherland RM. (Eds.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1984, 1-23.
- 35) Masami Harimoto, Masayuki Yamato, Motohiro Hirose, Chie Takahashi, Yuki Isoi, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano : Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture : overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res*, 62 : 464-470, 2002.
- 36) 竹澤俊明, 森 有一, 吉里勝利 : 温度感受性ポリマーを用いた新規細胞培養法による正常細胞スフェロイド形式. *TCRC*, 9(2) : 81 - 86, 1991.
- 37) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y : Corneal reconstruction with tissue - engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351 : 1187 - 1196, 2004.
- 38) Ohki T, Yamato M, Murakami D : Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue - engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* 55 : 1704 - 1710, 2006.
- 39) Memon IA, Sawa Y, Fukushima N : Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J IEhorac Cardiovasc Surg* 130 : 1333-1341, 2005.
- 40) Flores M Gomez, Hasegawa M, Yamato M, Takagi R, Okano T, Ishikawa I : Cementum-periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique. *J Periodont Res*, 43 : 364-371, 2008.
- 41) Yamamiya Kanoko, Okuda Kazuhiro, Kawase Tomoyuki, Hata Ken-ichiro, Wolff Larry F, Yoshie Hiromasa : Tissue-Engineered Cultured Periosteum Used With Platelet-Rich Plasma and Hydroxyapatite in Treating Human Osseous Defects. *J Periodontol*, 79, 811-818, 2008.
- 42) Okuda Kazuhiro, Yamamiya Kanoko, Kawase Tomoyuki, Mizuno Hirokazu, Ueda Minoru, Yoshie Hiromasa : Treatment of human infrabony periodontal defects by grafting human cultured periosteum sheets combined with platelet-rich plasma and porous hydroxyapatite granules : case series. *J Int Acad Periodontol*, 11 : 206-13, 2009.
- 43) Brian Johnston, Thomas M. Hering, Arnold I. Caplan, Victor M. Goldberg, Jung U. Yoo. In vitro chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Exp Cell Res*, 238: 265-272, 1998.
- 44) 辻上 弘, 出口眞二, 菅谷 彰, 茂木信道, 堀 俊夫 : ヒト歯周組織由来細胞における細胞凝集塊(スフェロイド)の形成 I, III型コラーゲンおよび細胞増殖活性に対する免疫組織化学的検索. *日歯周誌*. 37 : 294-301, 1995.
- 45) 辻上 弘, 出口眞二, 菅谷 彰, 茂木信道, 堀 俊夫 : ヒト歯周組織由来細胞における細胞凝集塊(スフェロイド)の形成(第2報) スフェロイドにおけるヒト歯根膜由来線維芽細胞(HPLF)の特徴について. *日歯周誌*. 37 : 650-657, 1995.
- 46) 吉川昌幸, 尾形 顕 : ヒト歯槽骨由来細胞スフェロイドにおける骨芽細胞マーカーの発現. *日歯周誌*. 48 : 276-284, 2006.
- 47) 東 一善 : 孤立線毛の電子顕微鏡的観察(3). マウス胆嚢上皮の粘液細胞の孤立線毛. *東邦医会誌*. 27 : 420-461, 1980.
- 48) 東 一善 : 孤立線毛の電子顕微鏡的観察(2). マウス胆嚢線維芽細胞に見出された孤立線毛. *東邦医会誌*. 27 : 415-419, 1980.
- 49) 東 一善, 佐々昭三 : ラット顎下腺主導管の基底細胞における孤立線毛の微細構造. *歯基礎誌*. 27 : 842-850, 1985.
- 50) Albrecht-buehler G, Bushnell A : The ultrastructure of primary cilia in quiescent 3T3 cells. *Exp Cell Res*. 126 : 427-437, 1980.
- 51) Wilsman NG, Cornelia EF, Debra KR : Incidence and morphology of equine and murine chondrocytic cilia. *Ant Rec*. 197 : 355-361, 1980.
- 52) Archer FL, Wheatley DN : Cilia in cell-cultured fibroblasts. *J Anat*. 109 : 277-292, 1971.
- 53) Dingemans KP : The relation between cilia and mitoses in the mouse adenohypophysis. *J Cell Biol*. 43 : 361-367, 1969.
- 54) 渡邊昌俊, 高木陽光 : 3次元培養における前立腺がん細胞の生物学的特性. *薬学雑誌*. 128 : 37-44, 2008.
- 55) 大塚英典, 片岡一則 : 高分子界面設計に基づくスフェロイドエンジニアリングへの展開. *再生医療*. 2 : 65 -76, 2003.
- 56) 浅利利正, 日野裕史 : スフェロイドティッシュエンジニアリング. *Surgery Frontier*. 11 : 181-183, 2004.
- 57) Bourne GH, Danielli JF : International review of cytology, the cytology of salivary glands, Academic press : 63, 162-163, 1980.